昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，August 2003，46（4）：540－544　　ISSN 0454-6296

褐飞虱肌动蛋白基因3′末端克隆与测序

刘美德，洪晓月*，杜建光，程遐年

（南京农业大学植物保护学院昆虫学系，南京　210095）

摘要：应用锚定的3′-RACE方法，对褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（Stål）肌动蛋白基因3′末端进行了扩增、克隆和测序，并对所得到的5个cDNA片段的不译端的序列进行了比较。结果显示：BPH-A和BPH-D与其他序列不同；BPH-B、BPH-C和PBH-E三条片段的不译端的序列很相似，只是长度不同。另外，所得序列中所含翻译区的氨基酸序列高度保守，根据肌动蛋白基因结构特点可以推断BPH-A和BPH-D属肌肉特异型肌动蛋白基因，BPH-B、BPH-C和BPH-E属细胞质特异型肌动蛋白基因。

关键词：褐飞虱；肌动蛋白；3′-RACE；基因表达

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2003）04-0540-05

Cloning and sequencing the 3′ terminal of the actin genes in the brown planthopper，*Nilaparvata lugens*（Stål）

LIU Mei-De，HONG Xiao-Yue*，DU Jian-Guang，CHENG Xia-Nian（Department of Entomology，Plant Protection College，Nanjing Agricultural University，Nanjing　210095，China）

Abstract：The 3′terminal of the actin genes in the brown planthopper，*Nilaparvata lugens*（Stål）was amplified，cloned and sequenced using the anchored 3′-RACE method. Through homologous comparison of these sequences in untranslated regions，we found that BPH-A and BPH-D were different from other sequences，and that BPH-B，BPH-C and BPH-E had the same sequence except for different 3′ terminal sites. The amino acid sequence of the 3′ terminal of the actin genes in *N. lugens* is highly conservative. According to structural characteristics of the actin genes，we conclude that BPH-A and BPH-D are muscle specific while BPH-B，BPH-C and BPH-E are cytoplasm specific.

Key words：*Nilaparvata lugens*；actin；3′- RACE；gene expression

褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（Stål）是一种远距离迁飞的重要水稻害虫，在我国除黑龙江、内蒙古、青海和新疆以外的省区广泛地发生与为害（程遐年等，1979）。褐飞虱成虫具明显的翅两型现象，短翅型属于定居繁殖型，长翅型成虫属于迁移型；长翅型的出现表明有外地虫源迁入或本地虫源即将迁出。由于其迁飞与飞行肌的活动是紧密相关的，所以飞行肌的研究对探明其迁飞的生理学和内在的调控机制具有深远的意义。肌动蛋白在所有的真核细胞中都有发现，它是细胞骨架的主要成分及各种形式的细胞和器官（肌肉）的运动的主要因子，并且它们在生物发育过程中的表达具有时空特异性。肌动蛋白是由一个由多个基因组成的家族所编码，肌动蛋白基因家族中蛋白编码区是相当保守的，一般在氨基酸水平上可达90%；而在3′非翻译区域，至今不能找到具有相同的3′非翻译区域的肌动蛋白基因（Fyrberg *et al*.，1981）。另有研究表明3′非翻译区域对mRNA的翻译和稳定起着至关重要的作用（石统东和吴玉章，1998），它不仅调控翻译产物，还控制翻译的时间和地点（Kwon and Hecht，1991）。我们对褐飞虱肌动蛋白基因的3′非翻译区域进行克隆并测序，以期对褐飞虱体内的肌动蛋白基因的特性有深入了解，并进一步揭示褐飞虱的翅型分化和迁飞的分子机理，为褐飞虱的田间种群动态监测以及防治策略提供有效的手段和理论依据。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39770500）；江苏省自然科学基金项目（BK97087）

作者简介：刘美德，男，1973年1月生，江西泰和人，博士生，研究方向为昆虫分子生物学

* 通讯作者 Author for correspondence，Tel：025-4395339，Fax：025-4395246，E-mail：xyhong@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2002-07-12；接受日期 Accepted：2003-02-10

1 材料和方法

1.1 供试虫源

供试褐飞虱是在（25±2）℃、相对湿度70%～85%的条件下，连续用黄熟期水稻筛选获得的褐飞虱长翅型品系。从若虫期开始一直到成虫期（羽化后4 h止），从每一发育期开始每隔4 h取一次样，样品以液氮速冻保存。

1.2 化学试剂

总RNA提取试剂盒（RNAgents Total RNA Isolation System）、dNTP（10 mmol/L）、M-MLV RT（200 U/μL）和Taq DNA聚合酶（5 U/μL），均为Promega公司产品；实验所用引物由中国科学院上海植物生理研究所合成；Rnsin（32 U/μL），华美公司产品；PCR产物回收与纯化试剂盒（Wizard™ PCR Preps DNA Purification System）购自Promega公司；DNA Marker（Genruler™ 100 bp DNA Ladder Plus）；Promega公司的Pgem® -T Easy Vector Systems；大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α由南京农业大学植物分子遗传实验室惠赠；*Eco*RⅠ内切酶，购自SABC。

1.3 总RNA提取

按照Promega公司总RNA提取试剂盒产品说明书提取试虫的总RNA，最后将所提取的总RNA沉淀溶解于无核酸酶的水中，然后用紫外扫描仪对RNA定量，并用无核酸酶的水把它的浓度定至1 μg/μL，然后在－70℃下保存备用。

1.4 cDNA第一条链的合成

本实验应用锚定下游反转录引物0422-7：5′>TCACACAGGAAACAGCTATGACTTTTTTTTTTTTTTA <3′，按M-MLV反转录酶说明书进行反转录反应，于－20℃保存反转录产物，以备下一步PCR反应用。

1.5 PCR反应

参考已发表的昆虫肌动蛋白氨基酸序列（一般此蛋白质的长度是376个氨基酸），并根据第351～358位氨基酸的序列，设计合成PCR简并引物。上游引物0422-6:5′>TT(T,C)CA(A,G)CA(A,G)ATGTGGAT(C,T)TC(A,G,C)AA(A,G)<3′(Salazar *et al*.，1994)；下游引物即反转录反应的锚定的下游引物。PCR反应参数设置为：首先94℃预循环2 min，然后94℃ 1 min，57℃ 1 min，72℃ 1 min，运行30个循环，最后72℃延伸10 min。

1.6 PCR产物的回收与纯化

参照PCR产物回收与纯化试剂盒（Wizard™ PCR Preps DNA Purification System）的方法，把RT-PCR反应中的各DNA条带纯化回收，并用电泳鉴定，定量，存于－20℃备用。

1.7 PCR产物的回收纯化片段的克隆与测序

参照Promega公司的Pgem® -T Easy Vector Systems说明书，以 *E. coli* DH5α为受体宿主菌，把上述各回收及纯化的产物进行克隆，并经质粒DNA提取（金冬雁等，1995）、*Eco*RⅠ酶切鉴定、二次PCR鉴定后，送北京赛百盛生物有限公司测序。

2 结果

2.1 褐飞虱肌动蛋白基因3′末端的RT-PCR

褐飞虱总RNA的RT-PCR反应可以扩增出5条特异性肌动蛋白基因3′末端，这表明在褐飞虱体内有5种不同的肌动蛋白基因表达，为以后工作方便，从大到小依次命名为BPH-A、BPH-B、BPH-C、BPH-D和BPH-E；从电泳照片中可以看出BPH-A和BPH-E表达量比其他3条要大。然后依次克隆5条片段，并测序。

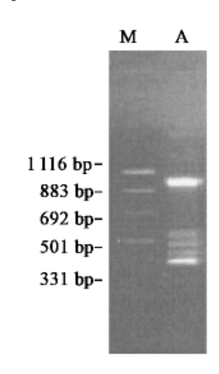


图1 褐飞虱肌动蛋白基因3′末端的RT-PCR

Fig. 1 RT-PCR of the actin gene 3′terminal in the brown planthopper

M：DNA分子量标准 Puc Mix DNA mark;

A：PCR产物 production of RT-PCR.

2.2 测序结果

2.2.1 3′末端克隆的序列比较：应用DNA STAR序列分析软件对测序结果进行分析，其中翻译区中的可变氨基酸 {S/G：TCA（C）/GGC} 和终止子密码子（TAA）以下划线标示，真核生物mRNA特有转录加尾信号（AATAAA）也以下划线标出。序列经比较分析后结果如图2所示。

```
1 TTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGAGGAGTACGACGAGTCCGGCCCAGGCATTGTCCACCGCAAGTGCTTCTAAA------CGCCAACCACTCCAACCA BPH-B
1 TTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGAGGAGTACGACGAGTCCGGCCCAGGCATTGTCCACCGCAAGTGCTTTTAAA------CGCCAACCACTCCAACCA BPH-C
1 TTCCAACAGATGTGGATCTCGAAAGAAGAGTACGACGAGTCCGGCCCAGGCATTGTCCACCGCAAGTGCTTCTAAA------CGCCAACCACTCCAACCA BPH-E
1 TTCCAACAGATGTGGATCTCCAAGGAGGAGTACGACGAGTCTGGTCCATCCATTGTCCACAGGAAGTGCTTCTAAG------CCCCCAACTGGACAACGC BPH-D
1 TTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGAGGAGTACGACGAGTCTGGCCCATCAATTGTGCACAGGAAGTGCTTCTAAATCATTTCCCTCTCCCCACCAACCC BPH-A

95 -----------CCAACACCAACACCACCACGCTACTTATTCTATTTATTTGCTATTCA-CTTTTCGT-ATTTCTATCTCG--TGAGTGATTTCGGGTGAA BPH-B
95 -----------CCAACACCAACACCACCACGCTACTTATT-TATTTATTTGCTATTCA-CTTTTCGT-ATTTCTATCTCG--TGAGTGATTTCGGGTGAA BPH-C
95 -----------CCAACACCAACACCACCACGCTACTTATTCTATTTATTTGCTATTCA-CTTTTCGT-ATTTCTATCTCG--TGAGTGATTTCGGGTGAA BPH-E
95 -----------CCCCACCCCTCCTCCCAACAACGCAAACCTTTCTTGTTTCCCCCACAGCATCACAT-CAATTTATTCCC--AAAACGTTTTGTCATTAT BPH-D
101 TATTTCTGTTCCCCTCTCCCCCCTTCTTTCGAGAAAGAGACTGCATGTGTGCGTGTGGTGGTTGTATTCCCCCTACTCCCCTTCATCATTCGACAACCAC BPH-A

180 C--TTCTCTTTAGGGAAGAC-----CGC---CGCCGAACACACTACTACTACAACAACCAAAACAAACACACAGACACA-----CACA-CACAGCA-ACG BPH-B
179 C--TTCTCTTTAGGGAAGAC-----CGC---CGCCGAACACACTACTACTACAACAACCAAAACAAACACACAGACACA-----CACA-CACAGCA-ACG BPH-C
180 C--TTCTCTTTAGGGAAGAC-----CGC---CGCCGAACACACTACTACTACAACAACCAAAACAAACACACAGACACAAA---CACA-CACAGCA-ACG BPH-E
181 CCATCATCATTCGGTATCAA-----TGTACATTCTAACCTCATTATTTATTTCATTATTTGTAAAAATGTTCTGTAAATTT---TGTAATTCAACA-AGT BPH-D
201 CATCCAGCGCGAGAGAGCAAACAAGCCCAACATCTACACATGGTTTTATTCTTTGTATTATATTATATATATTATTGCATTGTATTTGTCTCGTCGTGCC BPH-A

263 CTCTGCTCTGTCGGTCAACGCCATGTTCA---TGACGCATTATCACTGTGCAAA-TA-TCTCGG--AATAAAAAATCATTACAATTTCTTGGTTGACGGA BPH-B
262 CTCTGCTCTGTCGGTCAACGCCATGTTCA---TGACGCATTATCACTGTGCAAA-TA-TTTCGG--AATAAAAAATCATTACAATTTCTTGGTTGACGGA BPH-C
265 CTCTGCTCTGTCGGTCAACGCCATGTTCA---TGACGCATTATCACTGTGCAAA-TA-TTTCGG--AATAAAAAATCATTACAATTTAAAAAAAAAAAAA BPH-E
272 GTCTCCTATATTTATTACAGTAAATTTTG---TTGCCTTTACCTCCCATTCCTG-CACTTTCGG--TTCGTTCATTTGTTATTAACTTGTATTATTTATT BPH-D
301 GTGTTGTGTGTTGAGATGGACTAGTTCCAGGTCAACGGTTAACTGATGAATGGACTAGTTTTGATCAACGTTAACTGGTTTGAGAGGTGTGTGTGTTGCT BPH-A

356 ATCTCTCTTCAGCAAATTCCCTTCCAACCATACATACCAAAGAACAACAATTATAAGCTTTTGCCGACAGTTAAATAAATATATTTATTATTTTAAAATA BPH-B
355 ATCTCTCTTCAGCAAATTCCCTTCCAACCATACATACCAAAGAACAACAATTATAAGCTTTTGCCGACAGTTAAATAAATATATTTATTATTTTAAAATA BPH-C
358 AGTCAT----AGCTGTTTCCTGTGTGA BPH-E
366 GTGAATA--AAGCTGAAGTTTCTCTTGTTAAAAAAAAAAAAAAAGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA BPH-D
401 GCCAACTTTCTGGTCGCGTTCCATCATTCAAACACACAAAAACATCAAACACTTTCTTAATTTACTATTATCATAATATTATATATAT-ATATATATATG BPH-A

456 TTTCAAATTGAAA----TGTCTATTATTTGAATAAAATTAATTTATATTTATATTATAAAAAAAAAAAAAAAGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA BPH-B
455 AAAAAAAAAAAAAAGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA BPH-C
500 CATTCAATCAATATTTGTTTCTTCAATTCAATTATTAATTGTTTTGTGTATTATTTTTGGAAAACGTTTAAATGAAAAAATTTAAGAGAGAGAAGACACC BPH-A

600 ATTTTGCATTCCATTTTTCAAGTAATGTTAGTAGTTTTTTACATACATGACTGTGTATTGGCTGTTGAAGAATTACTTGGCCCGCGACGCAACTTCTATC BPH-A
700 AGTTGTGCTCCGATAATTATTGTGCTTTGTTTTTACTATTACTACTACAAGTATAATGAATATTATTTAAAGCGTAAGTAATTTAGGATTGTGGTTGTGC BPH-A
800 GCGCGTGTGCGAAAGTGCGCCCCAGCGAAAAGGGGTTAATGCACTCGACTCACCCGGCACAAGAAATGGATAGAACTTTTTTTATAATGCATTTTTCCCA BPH-A
900 TATGTGATCGTTGAAAATTGCACTAAGCCCAAAGTATTATTTATTCCCACGTGCAACAGATAGATGTGGAAAAATAAAAATTGATTATACATTTAAAAAA BPH-A
1000 AAAAAAAAGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA BPH-A
```

图 2　5 条克隆序列（BPH-A，B，C，D，E）的碱基对比

Fig. 2　Comparison of the sequences of five clones（BPH-A，B，C，D，E）

图 2 测序结果显示，BPH-A、BPH-B、BPH-C、BPH-D 和 BPH-E，长度分别为 1 030 bp、544 bp、489 bp、428 bp 和 380 bp，与电泳照片中各片段大小排列一致；在我们选取的氨基酸编码区，可以译出 24 个氨基酸，其片段的大小和氨基酸序列符合我们实验设计的要求：5 个克隆除在可变位点第 357 位氨基酸出现 S/G 变化外（BPH-A 和 BPH-D 在这一位置为“S”，而 BPH-B、BPH-C 和 BPH-E 则为“G”），其余都相同，而且在相同的地方出现了翻译终止密码子（TAA）。在 BPH-A、BPH-E 和 BPH-D 都只有一个加尾信号，而 BPH-B 和 BPH-C 则分别有 3 个和 2 个加尾信号，但是 5 条片段都是在最后一个加尾信号后 15～25 个碱基后出现多聚 A 的，这一点也符合真核生物 mRNA 的结构特点，而且 BPH-C、BPH-E 分别与 BPH-B 的第一和第二加尾信号前的碱基序列一致（除少数几个碱基出现变化）。以上结果表明我们所克隆的序列确实属于褐飞虱肌动蛋白基因的 3′末端序列。

2.2.2 序列的碱基相似性分析：利用 DNA STAR 序列分析软件对得到的褐飞虱肌动蛋白基因 3′末端的序列作序列相似性比较，结果见图 3。BPH-C 与 BPH-E 的相似度最高，达到 92.4%；BPH-B、BPH-C 和 BPH-E 相互之间相似度较高，达到 88% 以上；BPH-A 和 BPH-D 则分别表现出与其他序列很大的差异度。用 DAN STAR 作的聚类树结果（图 4）也可看出这种关系，BPH-B、BPH-C 和 BPH-E 可以较好的聚在一起，而 BPH-D 和 BPH-A 则相距较远。

序列同源性 Percent identity

序列差异性 Divergence

	1	2	3	4	5	
1		92.4	88.7	22.9	15.4	1
2	3.8		88.2	22.9	17.0	2
3	7.8	7.8		25.3	21.1	3
4	86.5	86.0	81.2		16.6	4
5	87.8	91.8	100.7	78.2		5
	1	2	3	4	5	

图3　5条克隆片段（BPH-A，B，C，D，E）的序列同源率与差异率矩阵图

Fig. 3　Homologous and different ratio matrix of five clones（BPH-A，B，C，D，E）

1. BPH-B；2. BPH-C；3. BPH-E；4. BPH-D；5. BPH-A.

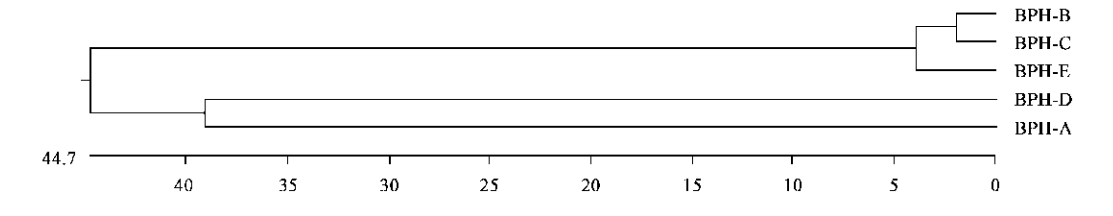


图4　5条克隆片段（BPH-A，B，C，D，E）的聚类关系树

Fig. 4　Phylogentic tree of five clones（BPH-A，B，C，D，E）

3　讨论

本实验从褐飞虱体内克隆出了5条肌动蛋白基因的3′末端。从克隆测序的结果看，它们在末端氨基酸序列上是相当保守的，除了第357位氨基酸有一定变化外（BPH-A和BPH-D在这一位置为“S”，BPH-B、BPH-C和BPH-E则为“G”），其余部位的氨基酸是相当保守的，这与肌动蛋白基因的氨基酸编码区的高度保守性是一致的；而第357位的氨基酸，正是已经发现的肌动蛋白基因家族在氨基酸编码区有限的可变化的位点之一（Fyrberg *et al*.，1981）。从已发表的有关肌动蛋白基因的氨基酸编码区的序列比较来看，在这一位点的氨基酸如果是“G”的话，则这一肌动蛋白基因为细胞质型肌动蛋白；如果是“S”的话则为肌肉型肌动蛋白（Haymer *et al*.，1990）。结合实验结果，我们可以推断BPH-A和BPH-D为肌肉型肌动蛋白，BPH-B、BPH-C和BPH-E为细胞质型肌动蛋白。这一方面与肌动蛋白基因在氨基酸编码区高度保守的特性相符合，另一方面也证明了我们所克隆的5条片段确实属于褐飞虱体内所表达的肌动蛋白基因的3′末端。

其次，从得到的5个cDNA片段的3′非翻译区域的序列比较来看，BPH-A和BPH-D分别与其它序列不同（序列相似度只有15.4%～25.3%），而BPH-B、BPH-C和BPH-E三条片段的3′非翻译区域的序列相似度是很高的（达88.2%～92.4%），只是长度上不同而已；另外从序列对比的结果来看，BPH-C、BPH-E分别与BPH-B在前两个加尾信号前的序列基本一致（除个别碱基差异）。鉴于肌动蛋白基因的结构特点，可以确定在褐飞虱体内的肌动蛋白基因家族至少有5个肌动蛋白基因。

另外从褐飞虱肌动蛋白基因3′末端的RT-PCR电泳结果看，BPH-A与BPH-E的表达量要比其他几个肌动蛋白基因要高，它们在褐飞虱体内的生理作用可能更为重要。考虑到BPH-A与BPH-D属于肌肉特异性肌动蛋白基因，它们的表达与褐飞虱的飞行肌发育紧密相关，在以后对褐飞虱在翅型分化中飞行肌的变化以及揭示其分子机制的研究工作中应作为主要的对象。

致谢　在研究过程中得到江苏省农业科学研究院植物保护研究所周益军研究员、范永坚研究员和武淑华副研究员的技术指导和帮助，谨此为谢！

参　考　文　献（References）

Cheng X N，Chen R C，Xi X，Yang L M，Zhu Z L，Wu J C，Qian R G，Yang J S，1979. Studies on the migration rules of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*（Stål）. *Acta Entomologica Sinica*，22（1）：1－21.［程遐年，陈若篪，习学，杨联民，朱子龙，吴进才，钱仁贵，

杨金生，1979. 褐飞虱迁飞规律的研究. 昆虫学报，22（1）：1－21]

Fyrberg E A，Bond B J，Hershey N D，Mixter K S，Davidson N，1981. The actin genes of *Drosophila*: protein-coding regions are highly conserved but intron positions are not. *Cell*，24：107－116.

Haymer D S，Anleitner J E，He M，Thanaphum S，Saul S H，Ivy J，Houtchens K，Arcangeli L，1990. Actin genes in the Mediterranean fruit fly: *Ceratitis capitata*. *Genetics*，125：155－160.

Kwon Y K，Hecht N B，1991. Cytoplasmic protein binding to highly conserved sequences in the 3′ untranslated region of mouse protamine 2 mRNA，a translationally regulated transcript of male germ cells. *Proc. Acad. Sci. USA*，88（9）：3 584－3 588.

Salazar C E，Hamm D M，Wesson D M，Beard C B，Kumar V，Collins F H，1994. A cytoskeletal actin gene in the mosquito: *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*，3（1）：1－13.

Jin D Y，Li M F（Translator），1995. Molecular Clone: A Laboratory Manual. Beijing: Science Press. 19－24.［金冬雁，黎孟枫（译），1995. 分子克隆实验指南（第 2 版）. 北京：科学出版社. 19－24]

Shi T D，Wu Y Z，1998. Function of eucaryotic RNA 3′ untranslated region in the gene expression. *Progress in Biochemistry and Biophysics*，25（3）：195－196.［石统东，吴玉章，1998. 真核 mRNA 3′非翻译区在基因表达中的作用. 生物化学与生物物理进展，25（3）：195－196]